

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



⑪ Numéro de publication : 0 631 776 A1

⑫

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt : 94401460.4

⑮ Int. Cl.<sup>6</sup> : A61K 31/175, A61K 31/165,  
A61K 31/12

⑯ Date de dépôt : 28.06.94

⑰ Priorité : 02.07.93 FR 9308111

⑲ Date de publication de la demande :  
04.01.95 Bulletin 95/01

⑳ Etats contractants désignés :  
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU NL  
PT SE

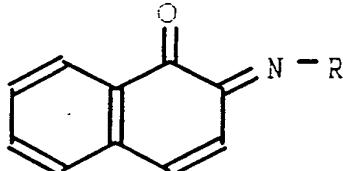
㉑ Demandeur : ROUSSEL-UCLAF  
35, Boulevard des Invalides  
F-75007 Paris (FR)

㉒ Inventeur : Bloy, Christian  
22, rue Marmontel  
F-75015 Paris (FR)  
Inventeur : Cazenave, Jean-Pierre  
10, rue Spielmann  
F-67085 Strasbourg Cédex (FR)  
Inventeur : Hercelin, Bernard  
20, rue Frédéric Raboisson  
F-60600 Clermont (FR)  
Inventeur : Teisseire, Bernard  
28, rue Rémy de Gourmont  
F-75019 Paris (FR)

㉓ Mandataire : Vieillefosse, Jean-Claude et al  
ROUSSEL UCLAF,  
111 Route de Noisy  
F-93235 Romainville Cédex (FR)

㉔ Utilisation de dérivés de la bêta-naphtoquinone pour l'accélération de la prolifération des cellules endothéliales et de l'inhibition des NO synthases.

㉕ Utilisation de dérivés de la bêta-naphtoquinone de formule (I) :



(I)

dans laquelle R est un groupement -NH-CO-NH<sub>2</sub> ou -NH-CO-CH<sub>3</sub> ou un hydroxyle, et leurs sels, pour la fabrication d'un médicament permettant d'accélérer la prolifération des cellules endothéliales et d'inhiber les NO synthases.

EP 0 631 776 A1

La présente invention concerne une nouvelle utilisation de dérivés de la béta-naphtoquinone ainsi que de leurs sels.

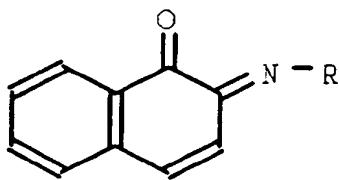
Le brevet Spécial de Médicament 924 M décrit l'application à titre de médicaments de dérivés de la béta-naphtoquinone. Selon ce brevet, ces dérivés sont présentés comme possédant des propriétés hémostatiques et des propriétés vitaminiques.

On sait que l'endothélium est constitué par une mono-couche de cellules d'origine mésodermique qui tapisse l'intérieur de tout le système vasculaire. Il constitue donc l'interface entre le sang et les tissus avoisinants. Cette localisation lui confère un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité vasculaire et sanguine.

Le détachement de la monocouche de cellules endothéliales non thrombogènes entraîne l'exposition du sous-endothélium thrombogène (adhésion plaquettaire et leucocytaire). L'exposition du sous-endothélium est une situation pathologique qui se retrouve dans certaines interventions chirurgicales : embolectomies, angioplasties, endartériectomie et greffes de prothèses vasculaires ou dans certaines situations de pathologie médicale (athérosclérose, vascularites). Toutes ces situations ont un intérêt commun qui est la reconstitution rapide d'une surface endothéliale intacte et fonctionnelle. Il a été démontré récemment que les facteurs de croissance polypeptidiques (FGF : fibroblast growth factor ; PDGF : platelet derived growth factor ou EGF : epidermal growth factor) jouent un rôle important dans la réparation de lésions vasculaires ou cutanées : ulcères, escarres et brûlures.

En poursuivant ses études sur les dérivés de la béta-naphtoquinone précités, la demanderesse vient de trouver de façon tout à fait inattendue que ces derniers présentaient une remarquable activité permettant d'accélérer la prolifération des cellules endothéliales et d'inhiber les NO synthases constitutive et induite.

La présente demande a ainsi pour objet une nouvelle utilisation de dérivés de la béta-naphtoquinone de formule générale (I) :



(I)

35 dans laquelle R représente un groupement de formule -NH-CO-NH<sub>2</sub>, ou un groupement de formule -NH-CO-CH<sub>3</sub>, ou un groupement hydroxyle, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables, pour la fabrication d'un médicament permettant d'accélérer la prolifération des cellules endothéliales et d'inhiber les NO synthases.

40 Les sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables peuvent être, par exemple, les sels formés avec les acides chlorhydrique, bromhydrique, iodhydrique, nitrique, sulfureux, phosphorique, propionique, formique, benzoïque, maléique, fumarique, succinique, tartrique, citrique, oxalique, glyoxylique, aspartique, alcanesulfoniques tels que les acides méthane et éthane sulfoniques et arylsulfoniques, tels que l'acide benzènesulfonique.

45 Parmi les dérivés de la béta-naphtoquinone de formule générale (I), on retient notamment :

- le produit de formule (I) dans laquelle R représente un groupement de formule -NH-CO-NH<sub>2</sub>, ainsi que ses sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables,
- le produit de formule (I) dans laquelle R représente un groupement de formule -NH-CO-CH<sub>3</sub>, ainsi que ses sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables,
- le produit de formule (I) dans laquelle R représente un groupement hydroxy, ainsi que ses sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables.

50 Parmi les produits préférés de l'invention, utilisés pour la fabrication d'un médicament permettant d'accélérer la prolifération des cellules endothéliales et d'inhiber les NO synthases, on retient tout particulièrement la 2-semicarbazone de la 1,2-naphtoquinone plus connue sous la dénomination commune internationale de naftazone. Dans la partie expérimentale, ce produit figure sous sa DCI (dénomination commune internationale).

55 En raison de ces remarquables propriétés permettant d'accélérer la prolifération des cellules endothéliales et d'inhiber les NO synthases, illustrées plus loin dans la partie expérimentale, les dérivés de la béta-naphtoquinone de formule (I), tels que définis ci-dessus, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables, peuvent être utilisés dans le domaine vasculaire, par exemple dans la prévention de l'hypotension du choc septique, de l'athérome, des resténoses artérielles (après

angioplastie), dans la protection vasculaire, dans les greffes et les prothèses vasculaires, dans la protection cérébrale lors du "stroke", ou dans le traitement de la douleur, comme antioedémateux par diminution de la perméabilité capillaire, dans le traitement de la migraine par fermeture des shunts artéioveineux cérébraux, dans les processus pathologiques impliquant la micro-circulation (en ophtalmologie, en diabétologie) comme dans les vascularités (en particulier microcavementeuses) et dans l'ensemble des processus de cicatrisation et réparation tissulaire.

La dose usuelle, variable selon le produit utilisé, le sujet traité et l'affection en cause, peut être par exemple de 1 mg à 100 mg par jour, par voie orale ou par voie injectable.

L'invention a également pour objet les compositions pharmaceutiques qui renferment à titre de principe actif l'un au moins des médicaments définis ci-dessus.

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être, par exemple, solides ou liquides et se présenter sous les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine, comme par exemple, les comprimés, simples ou dragéifiés, les gélules, les capsules, les granulés, les suppositoires, les préparations injectables ; elles sont préparées selon les méthodes usuelles. Le ou les principes actifs peuvent y être incorporés à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

Des procédés de préparation des dérivés de la béta-naphtoquinone de formule (I) ainsi que de leurs sels ont été décrits dans la littérature. On peut notamment citer les procédés décrits dans le brevet spécial de médicament 924M précité, ou dans le brevet français 2 103 504.

Il va être donné maintenant à titre non limitatif des exemples de compositions pharmaceutiques pouvant être utilisées dans la mise œuvre de l'invention.

#### 25 EXEMPLE 1 :

On a préparé des comprimés répondant à la formule suivante :

- Naftazone 10 mg
- Excipient q.s.p. pour un comprimé terminé à 150 mg

(détail de l'excipient : lactose, amidon, talc, stéarate de magnésium).

#### EXEMPLE 2 :

On a préparé un soluté injectable répondant à la formule suivante :

- Naftazone 5 mg
- Excipient aqueux stérile q.s.p. 2 ml

#### EXEMPLE 3 :

40 On a introduit 8.6 g de Naftazone dans 200 ml d'anhydride acétique. Après 10 heures de chauffage à 140°C, puis refroidissement, filtration, extraction du précipité par le chloroforme, évaporation à sec, reprise par l'éthanol, passage sur charbon actif, filtration et cristallisation lente, on a obtenu 5.1 g de produit répondant à la formule (I) avec R = -NH-CO-CH<sub>3</sub> (poudre microcristalline jaune ocre, F = 137-138°C).

#### 45 ETUDE PHARMACOLOGIQUE

##### **I - Etude in vitro de la prolifération des cellules endothéliales humaines de veine saphène**

Nous avons évalué les propriétés mitogéniques de la naftazone sur des cellules endothéliales humaines de veine saphène en culture dans des conditions standard.

La naftazone, à des concentrations comprises entre 10<sup>-5</sup> M et 10<sup>-7</sup> M, accélère la prolifération de cellules endothéliales, ensemencées à faible densité, d'un facteur 2 au maximum en comparaison du témoin (sans naftazone).

55 A confluence, la densité cellulaire reste légèrement augmentée (environ 20 %). Par contre, en présence de concentrations optimales de sérum, la différence de densité cellulaire entre le contrôle et les échantillons contenant la naftazone s'estompe.

En conclusion, dans les conditions de l'essai, l'effet de la naftazone reste en général inférieur ou égal à celui induit par les FGFS mais, à confluence, la densité cellulaire en présence des facteurs FGFS est nettement

supérieure à celle obtenue avec la naftazone, en comparaison du témoin.

## II - Etud d l'inhibition de la NO synthase c nstitutive des cellules endothéliales vasculaires

5 La naftazone a fait l'objet d'études réalisées sur anneaux (3 à 4 mm de long) d'aorte abdominale de rat CD (200-250 g, Charles River, France) et de veine fémorale de lapin New-Zealand (2-2.5 kg, Charles River, France).

10 Les anneaux sont placés en chambre d'organe (25 ml, Phymep, France) dans une solution de Krebs-Ringer. Cette solution est tonométrée en permanence par un mélange gazeux à 95 % O<sub>2</sub> - 5 % CO<sub>2</sub>, à pH 7,40 et thermostatée à 37°C. La force isométrique développée par les anneaux est mesurée par des capteurs de tension (Phymep, France). Les anneaux sont amenés à leur point optimal de la relation tension-longueur par des stimulations répétées à l'aide de KCl 40 mM. Les études pharmacologiques sont réalisées après rinçages et une période d'équilibre de 45 minutes. Lorsque la réponse pharmacologique du vaisseau est étudiée sans endothélium, celui-ci est éliminé par frottement de l'intérieur du vaisseau à l'aide d'une pince à dissection. L'absence d'endothélium est vérifiée par l'absence de relaxation du vaisseau induite par l'ACh 10<sup>-6</sup> M après contraction à NAD 10<sup>-7</sup> M. Les contractions sont exprimées en % de la contraction maximale à KCl 60 mM, les relaxations sont exprimées en % de la contraction à NAD 10<sup>-5</sup> M ou PGF2<sup>α</sup> 10<sup>-7</sup> M.

15 Les propriétés pharmacologiques suivantes ont été observées :

20 1 - la naftazone (10<sup>-6</sup> M - 10<sup>-4</sup> M) augmente significativement le tonus basal des anneaux aortiques de rat et de veine fémorale de lapin.

25 2 - la naftazone (10<sup>-6</sup> M - 10<sup>-4</sup> M) potentialise les contractions obtenues avec la NAD (10<sup>-9</sup> M - 10<sup>-5</sup> M) et avec la 5HT (10<sup>-9</sup> M - 10<sup>-5</sup> M) de façon significative et dose dépendante sur aorte de rat. Cette potentiation disparaît en l'absence d'endothélium.

30 3 - Sur anneaux aortiques contractés à la NAD (10<sup>-5</sup> M), la naftazone (10<sup>-6</sup> M - 10<sup>-4</sup> M) inhibe de façon significative et dose dépendante la relaxation à l'ACh (10<sup>-9</sup> M - 10<sup>-5</sup> M). L'inhibition atteint 60 à 80 % pour la naftazone (10<sup>-5</sup> M) pour une relaxation obtenue avec ACh (10<sup>-5</sup> M). Cette inhibition est comparable en cinétique, en amplitude, à celle obtenue avec le N<sub>ω</sub>-Nitro-L-Arginine (10<sup>-6</sup> M) (inhibiteur puissant des NO synthases).

35 4 - Sur des anneaux aortiques contractés à PGF2<sup>α</sup> (2.10<sup>-6</sup> M) en présence d'Indométhacine (10<sup>-5</sup> M) et de Kétansérine (10<sup>-5</sup> M), la naftazone (10<sup>-6</sup> M - 10<sup>-4</sup> M) inhibe la relaxation obtenue avec 5HT (10<sup>-9</sup> M - 10<sup>-5</sup> M) de façon significative et dose dépendante (10<sup>-6</sup> M - 10<sup>-4</sup> M).

40 5 - L'inhibition de la relaxation endothélium dépendante à l'ACh, à la 5HT et au A23187 obtenue avec la naftazone (10<sup>-5</sup> M) est levée totalement par la L-Arginine (9.10<sup>-4</sup> M).

55 6 - La naftazone (10<sup>-5</sup> M) inhibe de façon significative l'hyporéactivité à la NAD (10<sup>-9</sup> M - 10<sup>-5</sup> M) obtenue après 3 heures d'incubation d'anneaux aortiques de rat en présence de Lipopolysaccharides E. coli 011B4 (10 µm/ml). Cet effet est comparable à celui obtenu avec le N<sub>ω</sub>-Nitro-L-Arginine (10<sup>-5</sup> M).

7 - La naftazone (10<sup>-5</sup> M) potentialise la contraction à la NAD (10<sup>-9</sup> M - 10<sup>-5</sup> M) obtenue sur anneaux d'veine fémorale de lapin et inhibe la relaxation à l'ACh (10<sup>-9</sup> M - 10<sup>-5</sup> M).

En conclusion, l'augmentation du tonus basal, la potentiation des effets vasoactifs de la Noradrénaline, de la Sérotonine, l'inhibition des relaxations endothélium dépendantes à l'Acétylcholine, la Sérotonine et au Calcium ionophore A23187, la levée de l'inhibition des relaxations endothélium dépendantes par la L-Arginine, l'inhibition de l'hyporéactivité à la Noradrénaline induite par l'endotoxine bactérienne, font classer la naftazone comme inhibiteur de NO synthase constitutive et de NO synthase induite.

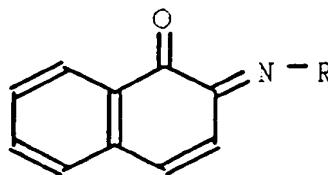
## Revendications

50

1) Utilisation de dérivés de la bêta-naphtoquinone de formule générale (I) :

55

5



(I)

10 dans laquelle R représente un groupement de formule -NH-CO-NH<sub>2</sub>, ou un groupement de formule -NH-CO-CH<sub>3</sub>, ou un groupement hydroxyle, ainsi que leurs sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables, pour la fabrication d'un médicament permettant d'accélérer la prolifération des cellules endothéliales et d'inhiber les NO synthases.

15 2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le dérivé de la béta-naphtoquinone est un produit de formule générale (I) dans laquelle R représente un groupement de formule -NH-CO-NH<sub>2</sub>, ainsi que ses sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables.

3) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le dérivé de la béta-naphtoquinone est un produit de formule générale (I) dans laquelle R représente un groupement de formule -NH-CO-CH<sub>3</sub>, ainsi qu' ses sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables.

20 4) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le dérivé de la béta-naphtoquinone est un produit de formule générale (I) dans laquelle R représente un groupement hydroxy, ainsi que ses sels d'addition avec les acides minéraux ou organiques pharmaceutiquement acceptables.

5) Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le dérivé de la béta-naphtoquinone est la 2-semicarbazone de la 1,2-naphtoquinone.

25

30

35

40

45

50

55



Office européen  
des brevets

## RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande  
EP 94 40 1460

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS													
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)										
D, A	FR-A-924M (ETABLISSEMENTS MARCEL DU BLED) 1961 * le document en entier * ---	1-5	A61K31/175 A61K31/165 A61K31/12										
A	LA GAZETTE MEDICALE, vol.100, no.20, 27 Mai 1993 page 38 PLOIN, M. 'ETIOVEN 10mg, MÉDICAMENT DE L'ANNÉE' * le document en entier * * surtout colonne 2, ligne 2 à 9 * ---	1-5											
A	AGRESSOLOGIE, vol.12, no.1, 1971 pages 25 - 30 LABORIT, H. ET AL 'EFFETS DE LA MONO-SEMICARBAZONE DE LA BETA-NAPHTOQUINONE DANS LE CHOC HÉMORRAGIQUE EXPÉRIMENTAL' * le document en entier * * surtout page 28, colonne 2, ligne 27-29 * -----	1-5											
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)										
			A61K										
<p>Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications</p> <table border="1"> <tr> <td>Lieu de la recherche</td> <td>Date d'achèvement de la recherche</td> <td>Examinateur</td> </tr> <tr> <td>LA HAYE</td> <td>13 Octobre 1994</td> <td>Mair, J</td> </tr> </table>				Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	LA HAYE	13 Octobre 1994	Mair, J				
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur											
LA HAYE	13 Octobre 1994	Mair, J											
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <table border="1"> <tr> <td>X : particulièrement pertinent à lui seul</td> <td>T : théorie ou principe à la base de l'invention</td> </tr> <tr> <td>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie</td> <td>E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date</td> </tr> <tr> <td>A : arrrière-plan technologique</td> <td>D : cité dans la demande</td> </tr> <tr> <td>O : divulgation non-écrite</td> <td>L : cité pour d'autres raisons</td> </tr> <tr> <td>P : document intercalaire</td> <td>A : membre de la même famille, document correspondant</td> </tr> </table>				X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention	Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date	A : arrrière-plan technologique	D : cité dans la demande	O : divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons	P : document intercalaire	A : membre de la même famille, document correspondant
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention												
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date												
A : arrrière-plan technologique	D : cité dans la demande												
O : divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons												
P : document intercalaire	A : membre de la même famille, document correspondant												